

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02112338.1

[51] Int. Cl⁷

C07K 19/00

C12N 15/11 C12N 15/63

C12N 15/64 A61K 39/395

A61P 29/00 A61P 19/02

A61P 37/02

[43] 公开日 2004 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN1465597A

[22] 申请日 2002.7.1 [21] 申请号 02112338.1

[71] 申请人 上海兰生上科创业投资有限公司

地址 200120 上海市浦东南路 528 号上海证券
券大厦北塔 2303 室

[72] 发明人 马 菁

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 余 颖

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 2 页

[54] 发明名称 含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和
白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的融合
蛋白，其制备方法，及其药物组合
物

[57] 摘要

本发明涉及含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体
p75 和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的融合蛋白，编
码所述融合蛋白的核酸分子，制备本发明融合蛋白
的方法以及含有本发明融合蛋白的药物组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

1. 一种融合蛋白，包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体，人免疫球蛋白 Fc 片段和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra，其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
2. 一种融合蛋白，包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体，连接序列和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra，其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4。
3. 一种核酸分子，编码权利要求 1 所述的融合蛋白，包含 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 所示的序列。
4. 一种核酸分子，编码权利要求 2 所述的融合蛋白，包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 所示的序列。
5. 一种表达载体，包含任选自 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8，和与之操作性连接的表达调控序列。
6. 一种宿主细胞，含有权利要求 5 所述的表达载体。
7. 根据权利要求 6 所述的宿主细胞，它是 CHO。
8. 权利要求 1 或 2 所述融合蛋白的制备方法，其步骤包括：
 - 1) 提供编码融合蛋白的核酸序列，所述序列选自 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8；
 - 2) 构建合适的表达载体；
 - 3) 将该表达载体导入合适的宿主细胞；
 - 4) 在适合表达的条件下培养转化宿主细胞；
 - 5) 收集上清液，并纯化融合蛋白产物。
9. 一种用于治疗类风湿性关节炎的药物组合物，其中包含权利要求 1 或 2 所述融合蛋白和药学上认可的载体。

含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的
融合蛋白，其制备方法，及其药物组合物

技术领域

5 本发明涉及含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的
融合蛋白，其制备方法，及其药物组合物。

背景技术

类风湿性关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)是一种世界范围内的常见疾病，体
现为四肢关节红、肿、疼痛，严重影响患者的生活质量，如不治疗，一般 2 年内
10 就可以造成关节强直畸形等永久性后遗症。在美国该病的发病率约为将近 1%[1]。
国内尚无可靠的发病率统计数字，估计与美国接近，是严重影响健康的疾病，对
社会造成的损失是难以估计的。

目前临床治疗 RA 的方案很多，首选用大剂量非甾体抗炎药可控制症状，如
无效，则临床首选氯甲蝶呤等免疫抑制药治疗。约四分之一的患者首次发病后经
15 及时治疗可终生不再复发，约二分之一的患者经治疗后症状暂时得以缓解，但仍
会反复发作，部分最终发展为关节功能障碍；约四分之一的患者对目前所有的常
规治疗均无效。

与 RA 炎症相关的细胞因子有白细胞介素-1(IL-1)，肿瘤坏死因子(TNF)，白
细胞介素 6(IL-6)等。这些细胞因子中，IL-1 是对炎症最有影响的起直接作用的物
20 质，它能引起严重的发炎。许多由 IL-1 诱发的炎症，可由 IL-1 受体拮抗剂预防
和消除，IL-1Ra 能抑制 IL-1 的全部作用，用 IL-1Ra(商品名为 Antri)治疗败血性
休克的 I、II、III 期的临床研究取得较好的疗效。给急性类风湿关节炎病人皮下
注射可溶性人重组 IL-1RI，每天 125-1000ug/m²，连续 28 天，约有半数病人的症状和
25 体症明显改善。促进 IL-1 释放的物质，如脂多糖和内毒素也能间接引起炎症，因
此通过阻断 IL-1 的释放，抑制 IL-1 的生成或抑制 IL-1 重转化酶(ICE)也能防止或
消除炎症。

对 RA 直接作用的药物包括 IL-1 受体抗体、天然多肽类 IL-1 受体拮抗剂、天
然有机化合物，及有机合成小分子。IL-1 受体拮抗剂细胞因子是复杂的天然产物，
包括能产生发炎和抗炎作用的化合物，IL-1 和 IL-1 受体拮抗剂的平衡是一个精确

的调控机制，它控制体内的发炎反应。如果发炎过于严重，IL-1受体拮抗剂会适度释放以保证发炎作用不至毁坏机体。如果体内 IL-1受体拮抗剂释放不足，可采用注射的方法来对抗 IL-1的作用。许多天然有机化合物能够阻滞由内毒素引起的 IL-1 的释放，但仅有少数具有能够在受体部位对抗 IL-1 的作用。

5 对 RA 的发病机理进行研究发现，TNF 在该疾病的病理进程中也起着十分关键的作用，患者或动物模型病变关节腔内的 TNF 水平异常升高^[4-7]。TNF 是机体内的一种多功能免疫调节分子，它可以和细胞膜上的受体结合发挥作用，往往引起靶细胞的死亡(它的名称即来源于此)或招引免疫效应细胞在局部的聚集。由于目前尚不十分清楚的原因，它在关节腔内的含量大量升高，一方面和关节滑膜细胞的受体结合造成该细胞直接损伤，另一方面，它可以召集免疫效应细胞聚集至此，分泌更多的细胞因子，产生更强更持久的自身免疫反应。

10 将抗体分子片段与其它蛋白融合可得到具有多种生物学功能的融合蛋白，可将其分为二大类，一类是将 Fv 段与其它生物活性蛋白结合，利用抗体的特异性识别功能将某些生物活性引导子特定部位，导向治疗是其主要应用领域。另一类是含 Fc 段的抗体融合蛋白。Fc 段可赋予免疫粘附素以下功能：(1)通过与抗 Ig 或蛋白 A 结合用于检测或纯化；(2)Fc 段介导的抗体效应功能，如 ADCC、固定补体及调理作用等；(3)增加该蛋白在血液中的半衰期。

15 国外有人借助基因工程手段构建了人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体(sTNF-RII，又称为 p75)与人 Ig 抗体 Fc 片段的融合蛋白，研究发现该融合蛋白在离体条件下对 TNFa 有中和作用，因此有可能开发成功治疗类风湿关节炎的特效药物。

20 基于以上所述，为了提供治疗 RA 更有效，更稳定的融合蛋白类药物，本发明进行了进一步的改进，将 p75 基因与 IL-1 受体拮抗剂 IL1Ra 采用生物工程手段进行连接，将它们的融合基因在适当的载体中进行表达，制备出功能性的融合蛋白。

25

发明内容：

1. 发明目的

本发明的目的一在于提供含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体(p75)和白介素 I 受体拮抗剂 IL-1Ra 的融合蛋白。

本发明目的还在于提供编码所述融合蛋白的核酸分子。

30

本发明目的还在于提供制备本发明融合蛋白的方法。

本发明目的还在于提供含有本发明融合蛋白的药物组合物。

2. 技术方案

为了实现本发明的目的，本发明实施了以下技术方案。

本发明提供了一种融合蛋白，包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体，人免疫球蛋白 Fc 片段和白介素 1 受体拮抗剂 IL1Ra，其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1。

该融合蛋白的成熟活性形式共含 619 个氨基酸，其中第 1-235 位是 p75 的氨基酸序列(GeneBank NM_001066)，第 236-467 位是人 Fc 片段的氨基酸序列，第 468-619 位是 IL-1Ra 的氨基酸序列(GeneBank X50125)。当然，也可以将 p75 连接于 Fc 片段的 C 端而将 IL-1Ra 连接于其 N 端，得到 SEQ ID NO:2 所示的融合蛋白
10。

本发明还提供了另一种融合蛋白，包含人可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体，连接序列和白介素 1 受体拮抗剂 IL1Ra，其氨基酸序列包含 SEQ ID NO:3。

该融合蛋白的成熟活性形式共含 619 个氨基酸，其中第 1-152 位是 IL-1Ra 的氨基酸序列(GeneBank X50125)，第 153-167 位是连接序列，第 168-402 位是 p75 的氨基酸序列(GeneBank NM_001066)。同理，也可以将 IL-1Ra 连接于连接序列的 C 端而将 p75 连接于连接序列的 N 端，得到 SEQ ID NO:4 所示的融合蛋白。
15

当将两个基因或基因片段重组成一个编码区构成融合蛋白的编码序列时，两个目标片段之间往往需要加入一个连接序列。连接序列的长度对两蛋白的折叠和稳定性非常重要。如果连接序列太短，可能影响两蛋白高级结构的折叠，从而互
20 相干扰，如果连接序列太长，又涉及免疫原性的问题。设计连接序列时应遵循的一般原则包括：1)要使用其编码的多肽不能具有形成二级结构的能力；2)其编码的多肽不能由糖基化信号；3)不能有过多的疏水氨基酸。有鉴于此，本发明设计了具有较好的弹性和疏水性的连接序列(Gly4Ser)₃(SEQ ID NO:9)，将 IL-1Ra 和可溶性肿瘤坏死因子受体 p75 分别连接于其两端。获得的融合基因克隆到真核表达
25 载体，使其在 CHO 细胞中获得高效表达。

根据以上所述的氨基酸序列，本技术领域人员可方便地用各种已知方法制得本发明的融合蛋白。这些方法例如但不限于：重组 DNA 法，人工合成，等[参见 Murray KM, Dahl SLAnn: Pharmacother 1997 Nov;31(11):1335-8]。此外，本发明提供了编码本发明的融合蛋白核酸分子之一，包含 SEQ ID NO:5 或 6 所示的序列
30。本发明还提供了编码本发明另一融合蛋白的核酸分子，包含 SEQ ID NO:7 或 8 所示的序列。

虽然以上给出了编码本发明融合蛋白的特定的 DNA 分子核苷酸序列，但是，

本文所述的编码核酸包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)，还包括由核苷酸类似物形成的DNA或RNA的等效物、类似物，单链(有义链或反义链)和双链寡核苷酸。还包括以上所述序列的同源序列。

本发明还提供了一种表达载体，包含一段选自 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:8 5 的序列和与之操作性连接的表达调控序列。表达载体可采用市售的例如但不限于：pDR(New England Biolabs 产品), pUC18 等可用于真核细胞系统表达的载体。本领域技术人员不难根据宿主细胞来选择合适的表达载体，例如，当本发明选择 CHO 为宿主细胞时，即可确定 pDR 为其适合的表达载体之一。将本发明的编码核酸序列导入所选的空载体中即可得到本发明的表达载体。本发明实施方式之 10 一是含有本发明融合蛋白编码序列 SEQ ID NO:3 的质粒 pDR-(p75Ig-IL1Ra)，其酶切特征见图 2。

本发明还提供了表达本发明融合蛋白的宿主细胞，其中含有本发明的编码序列 SEQ ID NO:3 或 4。所述的宿主细胞为常用的真核细胞，例如但不限于 CHO, COS 细胞, 293 细胞, RSF 细胞等。

15 本发明还提供一种用重组 DNA 制备本发明融合蛋白的方法，其步骤包括：
1) 提供编码融合蛋白的核酸序列，所述序列选自 SEQ ID NO:5 至 SEQ ID NO:8；
2) 构建合适的表达载体；
3) 将该表达载体导入合适的宿主细胞；
20 4) 在适合表达的条件下培养转化宿主细胞；
5) 收集上清液，并纯化融合蛋白产物。

根据本文所述的核苷酸序列，本技术领域人员可方便地用各种已知方法制得本发明的编码核酸。这些方法例如但不限于：制备 PCR, DNA 合成(J. 萨姆布鲁克，《分子克隆实验指南》)。

25 根据已知空载表达载体的酶切图谱，本领域技术人员可按照常规方法通过限制性酶剪切与拼接，将本发明的编码序列插入合适的限制性位点，制得本发明的表达载体，例如图 2 所示的 pDR-(p75Ig-IL1Ra) 和图 3 所示的 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)。

30 实施方式之一中，可通过交叠 PCR 来构建本发明的编码核酸序列，参见图 1，其中，基于已知序列的引物设计，制备，以及 PCR 反应参数的设定和控制可参考 US6406863 中所述的 PCR 反应。

将所述编码序列导入宿主细胞可采用本领域的多种已知技术，例如但不限

于：磷酸钙沉淀，原生质体融合，脂质体转染，电穿孔，微注射，反转录法，噬菌体转导法，碱金属离子法。

有关宿主细胞的培养和表达可参见 Olander RM Dev Biol Stand 1996;86:338。

可通过离心去除悬浮液中的细胞和残渣，收集清液。可通过电泳进行鉴定。

5 本发明还提供了含有本发明融合蛋白和药学上认可的载体的用于治疗 RA 的药物组合物。除作为有效成分的本发明融合蛋白之外，所述药物组合物中还可含有常规赋形剂，并可制成各种剂型。相关内容可参见《最新药物制剂技术及应用》安书麟、王宪洪等译。

通过以上所述并结合后文实施方式，本领域技术人员不难看出本发明的上述

10 及其他特征和优点。

附图说明

图 1：本发明构建的 pDR-(p75Ig-IL1Ra)的酶切图。其中，HCMV—人细胞巨化病毒启动子，是主要瞬时早期启动子；BGH pA—牛生长激素多聚腺嘌呤信号；SV40 ori—猿病毒 40 早期启动子和复制起始位点；DHFR—二氢叶酸还原酶基因；pUC ori—质粒的复制起始位点；AmpR— β -内酰胺酶基因。

图 2：本发明构建的 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)的酶切图。

具体实施方式

实施例 1：p75-Ig-IL1Ra 融合蛋白的表达

20 1. 构建含编码核酸 SEQ ID NO:1 的质粒 pGEMT-(p75-Ig-IL1Ra)

1. 1：pGEMT-p75Ig 的制备：

根据 p75 序列设计 5' 端引物 P1(SEQ ID NO:11)：

5'CAGaaagcttATGttgcggccggcagggtggcattcacccctac

其中，在 5' 端依次引入 3 个保护碱基 CAG，一个 HindIII 酶切位点 aaagctt，

25 和一个起始密码子 ATG。

根据 p75 序列和 Ig 序列设计跨接 p75 的 3' 端和 Ig Fc 的 5' 端的引物 P2(SEQ ID NO:12)：

5'gtcgaggactgggttcgtccatgtcccttc

设计的多核苷酸片段委托上海生工生物工程有限公司代为合成并进行 PAGE

30 纯化，参照文献 Chrisostomos Prodromou and Laurence H, Pearl(1992)的方法进行片段的合成。

合成好的片段按照 22 μ g/ μ l 的浓度溶于灭菌的三蒸水中，以 p75 的序列 (GeneBank NM_001066) 为模板，以 P1 和 P2 作为引物，用市售 PCR 试剂盒按照以下方法进行 PCR：

反应体系的组成：

成分	数量 (μ l)
10X PCR 反应缓冲液	10
25 mM Mg ₂₊ SO ₄	10
Taq 酶 (5U/ μ l)	2
引物 (2 μ g/ml)	各 1 μ l
模板 (2ug/ml)	
灭菌三蒸水	至 100 μ l

5 反应条件：

预变性：94℃，2 分钟；
 主循环：94℃，1 分钟；55℃，1 分钟；72℃，3 分钟；
 循环数：20
 后延伸：72℃，5 分钟。

10 PCR 过程在 PROGENE Genium 热循环仪上进行。

按照上述条件进行 PCR。完毕后将产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳进行鉴定，发现有一条分子量在 720bp 左右的条带，用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段，操作按照厂家的说明书进行。

15 根据 Ig 片段的序列设计 3'端引物 P3(SEQ ID NO:13)：

5'-cttgcggggggacaggac

以 Ig Fc 片段的序列(GeneBank X52015)和以上制得的 720bp DNA 片段为模板，以 p75 的 5'端引物 P1 和 Ig Fc 片段的 3'端引物 P3 作为引物，用市售 PCR 试剂盒如前所述进行 PCR。

20 完毕后将产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上进行鉴定，发现有一条分子量在 1400bp 左右的条带，用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段，操作按照厂家的说明书进行。

获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上后转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。通过酶切鉴定和测序确认了一个序列完全正确的克隆，即为 pGEMT-

25 (p75-Ig)。

1. 2: pGEMT-IL1Ra 的制备:

根据 IL1Ra 的序列设计引物上游引物(5')P4(SEQ ID NO:14)和下游引物(3')P5(SEQ ID NO:15):

P4: 5'CAGcgacccttcggagaaaaatccagcaag

5 P5: 5'CAGaattcctcgtcctctggaagtag

其中, cag 为保护碱基, gaattc 为 EcoR I 酶切位点引物委托上海生工生物工程有限公司代为合成并进行 PAGE 纯化。

以 IL1Ra 序列(GeneBank X50125)为模板, 以 P4 和 P5 为引物, 按前述方法和条件进行 PCR。在琼脂糖凝胶上电泳, 获得分子量约为 460bp 的条带, 进行凝胶回收。

获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上后转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。通过酶切鉴定和测序确认序列完全正确的克隆, 为 pGEMT-IL1Ra。

1. 3: pGEMT-(p75-Ig-IL1Ra)即(SEQ ID NO:1)的获得:

15 根据 IL1Ra 和 Ig 的序列设计跨接 IL1Ra 的 5'端和 Ig 的 3'端的引物 P6(SEQ ID NO:16):

5'gtccctgtccccggcaagcgacccttcggagaaaaatc

以前面制备的 pGEMT-p75Ig 和 pGEMT-IL1Ra 为模板, 以 IL1Ra 的下游引物 P5 和跨接引物 P6 为引物, 按照前面方法进行 PCR。完毕后将产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上进行鉴定, 回收分子量约在 475bp 的条带, 纯化获得 DNA 片段。以该片段和 pGEMT-p75Ig 为模板, 以 P1 和 P5 为引物进行 PCR, 然后产物进行琼脂糖电泳, 发现有一条分子量在 1857bp 的条带, 用 Promega 公司的胶回收试剂盒回收该片段, 操作按照厂家的说明书进行。

25 获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上, 转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。通过酶切鉴定和测序确认了一个序列完全正确的克隆, 即为 pGEMT-p75-Ig-IL1Ra(SEQ ID NO:1)。

2. 表达载体 pDR-(p75-Ig-IL1Ra)的构建

用 HindIII 和 EcoRI(Promega)双酶消化, 将 p75-Ig-IL1Ra 基因片段从 30 pGEMT-(p75Ig-IL1Ra)载体上切下, 克隆到经同样双酶消化的 pDR 载体(New England Biolabs 产品)中, 得到 pDR-(p75-Ig-IL1Ra)。酶切鉴定构建的表达载体。

3. CHO 细胞的转染

用脂质体转染法将表达载体 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)导入 CHO-dhfr⁻细胞(从 Invitrogen 或 Gibco 公司购买获得)。转染试剂盒购自 Invitrogen 公司，转染操作程序按照厂家的说明书进行。转染进行 24 小时后换选择培养基进行筛选，
5 选择培养基为：15%胎牛血清(Gibco)+RPM1640/DEME。于 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养。待克隆形成后用二氢叶酸还原酶抑制剂氨基喋呤(MTX)进行加压筛选，浓度从 2×10^{-8} mol/L 到 5×10^{-7} mol/L 梯度加压，用有限稀释法进行亚克隆。

4. 表达

10 将筛选得到的高表达克隆用无血清培养基 CHO-S-SFM II 培养基(Gibco 公司产品)扩大培养：PH 值为 7.0-7.2；温度 37±0.1℃；葡萄糖浓度 1.0-1.5g/L。

产物蛋白为分泌型，用离心收集的方法去掉细胞和细胞残渣后，获得含有表达产物的上清。

15 rProtein A 亲和层析柱分离纯化表达的融合蛋白。将纯化后融合蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析：将经离子交换柱层析纯化后的蛋白上样 10μg 进行 SDS-PAGE 后以考马司亮蓝 G250 染色；相同纯化样品上样 6μg 行 SDS-PAGE 后以硝酸银染色，以 BECKMAN DU650 分光光度计分别对两种染色的着色带进行光谱分析，以确定最佳扫描波长(考马司亮蓝染色：600nm；硝酸银染色：490nm)，然后进行胶扫描(每毫米读数 2 次)，经仪器对扫描峰进行自动面积积分，得出目
20 的蛋白峰的含量和纯度。实验结果显示，我们所得到的蛋白纯度不低于 98%。

实施例 2：IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白的表达

1. pGEM-(IL1Ra-连接序列-p75)即编码核酸 SEQ ID NO:3 的制备

参见图 1b，本发明通过交叠 PCR 构建编码 IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白的 SEQ
25 ID NO:3 序列。其中，实线表示 IL1Ra 基因，虚线表示 p75Ig 基因。箭头表示基因从 5'-3' 方向复制。PCR1 反应使用引物 a 和 b，以 pGEMT-IL1Ra 载体为模板生成 ab 产物(IL1Ra)。PCR2 反应是另一个 PCR 反应，使用引物 c 和 d，以 pGEMT-p75
载休为模板生成 cd 产物(p75)。Oligo-b 的 5' 端与 oligo-c 的 5' 端互补。交叠 PCR
即在已经获得 ab 和 cd 片段的情况下，使用引物 a 和 d，Oligo-b 的 5' 端与 oligo-c
30 的 5' 端互补所成单链为模板继续 PCR 反应，得到完整的长链融合基因。

根据前面所述的 IL1Ra 和 p75 序列以及连接序列，设计如下引物：

跨接引物 P7(SEQ ID NO:17)：

aatgccacctggcggcaaGGAGCCGCCGCCGGAGCCGCCGGAGCCG

CCGCCGCCctcgccctcctggaaagttag

该引物的 5'端与 p75 的 5'端重叠，中间大写划线部分为连接序列(45bp)，3'端与 IL1Ra 的 3'端重叠。

IL1Ra 的 5'端引物 P8(SEQ ID NO:18):

5 P8: 5'CAGaagcttATGcgaccctctgggagaaaatccagcaag

其中，在 5'端依次引入保护碱基 CAG，HindIII 酶切位点 aagctt 和一个起始密码子 ATG。

p75 的 3'端引物 P9(SEQ ID NO:19):

10 P9: 5'CAGGaaattcgcgtcgccagtgctcccttcagc

其中，在 5'端依次引入保护碱基 CAG 和 EcoRI 酶切位点 gaattc。
以实施例 1 制备的 pGEMT-IL1Ra 为模板，以 P7 和 P8 为引物，按前述方法和条件进行 PCR。产物在琼脂糖凝胶上电泳，获得分子量约为 500p 的条带，进行凝胶回收获得所需的 DNA 片段。然后以该产物与前述 pGEMT-(p75-Ig)为模板以 P8 和 P9 为引物，进行 PCR，产物在琼脂糖凝胶上电泳，获得分子量约为 1200bp
15 的条带，进行凝胶回收获得所需的 DNA 片段 IL1Ra-连接序列-p75，即 SEQ ID NO:3。

获得的 DNA 按照常规方法克隆到 pGEMT 载体上后转化大肠杆菌并进行蓝白斑筛选。

通过酶切鉴定和测序确认序列完全正确的克隆 pGEMT-(IL1Ra-连接序列-p75)。

20

2. 表达载体 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)的构建

用 HindIII 和 EcoRI(Promega)双酶消化，将 IL1Ra-连接序列-p75 基因片段从 pGEMT-(IL1Ra-连接序列-p75)载体上切下，克隆到经同样双酶消化的 pDR 载体(New England Biolabs 产品)中，得到 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)。酶切鉴定构建
25 的表达载体。

3. CHO 细胞的转染

用脂质体转染法将表达载体 pDR-(IL1Ra-连接序列-p75)导入 CHO-dhfr⁻细胞(从 Invitrogen 或 Gibco 公司购买获得)。转染试剂盒购自 Invitrogen 公司，转染操作程序按照厂家的说明书进行。转染进行 24 小时后换选择培养基进行筛选，
30 选择培养基为：15%胎牛血清(Gibco)+RPM1640/DEME。于 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养。待克隆形成后用二氢叶酸还原酶抑制剂氨基喋呤(MTX)进行加压筛选，浓度从 2×10^{-8} mol/L 到 5×10^{-7} mol/L 梯度加压，用有限稀释法进行亚克隆。

4. 表达

将筛选得到的高表达克隆用无血清培养基 CHO-S-SFM II 培养基(Gibco 公司产品)扩大培养。PH 值为 7.0-7.2; 温度 37±0.1°C; 葡萄糖浓度 1.0~1.5g/L。

产物蛋白为分泌型产物，用离心收集的方法去掉细胞和细胞残渣后，获得含有表达产物的上清。

- 5 rProtein A 亲和层析柱分离纯化表达的融合蛋白。将纯化后融合蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析：将经离子交换柱层析纯化后的蛋白上样 10μg 进行 SDS-PAGE 后以考马司亮蓝 G250 染色；相同纯化样品上样 6μg 行 SDS-PAGE 后以硝酸银染色，以 BECKMAN DU650 分光光度计分别对两种染色的着色带进行光谱分析，以确定最佳扫描波长(考马司亮蓝染色：600nm；硝酸银染色：490nm)，
- 10 然后进行胶扫描(每毫米读数 2 次)，经仪器对扫描峰进行自动面积积分，得出目的蛋白峰的含量和纯度。实验结果显示，我们所得到的蛋白纯度不低于 98%。

序列表

<110> 上海兰生上科创业投资有限公司

5 <120> 含可溶性肿瘤坏死因子 II 型受体和白介素 I 受体拮抗剂 IL1Ra 的融合蛋白, 其
制备方法, 及其药物组合物

<130> 023430

10 <160> 19

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

15 <211> 619

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

20 <221> misc_feature

<223> p75-Ig-IL1Ra 融合蛋白

<400> 1

25 Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
30 35 40 45
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80
35 Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
40 115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
 130 135 140
 Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
 145 150 155 160
 5 Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
 165 170 175
 Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
 180 185 190
 His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
 10 195 200 205
 Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
 210 215 220
 Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 15 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 20 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 25 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Asp Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Met
 340 345 350
 Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 35 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Arg His Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 35 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 40 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe
 465 470 475 480
 5 Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln
 485 490 495
 Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys
 500 505 510
 Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His
 10 515 520 525
 Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg
 530 535 540
 Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys
 545 550 555 560
 15 Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr
 565 570 575
 Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met
 580 585 590
 Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val
 20 595 600 605
 Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
 610 615

25 <210> 2
 <211> 619
 <212> PRT
 <213> 人工序列

30 <220>
 <221> misc_feature
 <223> IL1Ra-Ig-p75 融合蛋白

35 <400> 2

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
 1 5 10 15
 Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
 20 25 30

40 Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val

	35	40	45
	Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys		
	50	55	60
	Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu		
5	65	70	75
	Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys		80
	85	90	95
	Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu		
	100	105	110
10	Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp		
	115	120	125
	Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr		
	130	135	140
	Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
15	145	150	155
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		160
	165	170	175
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	180	185	190
20	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	195	200	205
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	210	215	220
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
25	225	230	235
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Asp Tyr		240
	245	250	255
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Met Gln Lys Thr		
	260	265	270
30	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	275	280	285
	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	290	295	300
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Arg His Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
35	305	310	315
	Asn Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		320
	325	330	335
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	340	345	350
40	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		

	355	360	365
	Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	370	375	380
	Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser		
5	385	390	395
	Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys		
	405	410	415
	Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr		
	420	425	430
10	Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu		
	435	440	445
	Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser		
	450	455	460
	Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys		
15	465	470	475
	Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys		
	485	490	495
	Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala		
	500	505	510
20	Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro		
	515	520	525
	Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His		
	530	535	540
	Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala		
25	545	550	555
	Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val		
	565	570	575
	His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr		
	580	585	590
30	Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly		
	595	600	605
	Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp		
	610	615	
35			
	<210> 3		
	<211> 402		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		

<220>
 <221> misc_feature
 <223> IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白

5 <400> 3

	Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp			
1	5	10	15	
	Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala			
10	20	25	30	
	Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val			
	35	40	45	
	Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys			
	50	55	60	
15	Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu			
	65	70	75	80
	Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys			
	85	90	95	
	Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu			
20	100	105	110	
	Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp			
	115	120	125	
	Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr			
	130	135	140	
25	Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
	145	150	155	160
	Gly Ser Gly Gly Ser Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro			
	165	170	175	
	Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp			
30	180	185	190	
	Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala			
	195	200	205	
	Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu			
	210	215	220	
35	Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser			
	225	230	235	240
	Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr			
	245	250	255	
	Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala			
40	260	265	270	

Leu Ser Lys Gin Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys
 275 280 285
 Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val
 290 295 300
 5 Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser
 305 310 315 320
 Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro
 325 330 335
 Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg
 10 340 345 350
 Ser Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg
 355 360 365
 Ser Gin His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr
 370 375 380
 15 Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr
 385 390 395 400
 Gly Asp

20 <210> 4
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> 人工序列

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> p75-连接序列-IL1Ra 融合蛋白

30 <400> 4

Leu Pro Ala Glu Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 35 20 25 30
 Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45
 Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60
 40 Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser

	65	70	75	80
	Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys			
	85	90	95	
	Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys			
5	100	105	110	
	Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala			
	115	120	125	
	Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro			
	130	135	140	
10	Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His			
	145	150	155	160
	Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala			
	165	170	175	
	Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val			
15	180	185	190	
	His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr			
	195	200	205	
	Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly			
	210	215	220	
20	Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Gly Gly Ser			
	225	230	235	240
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Pro Ser Gly Arg Lys			
	245	250	255	
	Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr			
25	260	265	270	
	Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro			
	275	280	285	
	Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His			
	290	295	300	
30	Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val			
	305	310	315	320
	Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr			
	325	330	335	
	Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg			
35	340	345	350	
	Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly			
	355	360	365	
	Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr			
	370	375	380	
40	Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu			

385	390	395	400
Asp Glu			
5			
<210> 5			
<211> 1857			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
10			
<220>			
<221> misc_feature			
<223> p75-Ig-IL1Ra 融合蛋白的编码序列			
15 <400> 5			
ttggccggccc aggtggcatt tacaccctac gccccggagc ccggggagcac atggccggctc agagaataact atgaccagac agctcagaat tgctgcagca aatgtctcgcc gggccaaacat gcaaaaagtct tcttgtaccaa gacctcggac accgtgtgtg acttctgtga ggacagcaca 20 tacacccaggc tcttggaaactg gtttcccgag tgcttgagct gtggctcccg cttagtct gaccagggtgg aaactcaagc ctgactctgg gaacagaacc gcatactgcac ctgcaggccc ggctgttact gcgcgcgtgag caagcaggag ggggtccggc tctgcgcgc gctgcgcgaag tgcgcgcgcg gcttcggcgt gcccagacca ggaactgaaa catcagacgt ggtgtgcgaag cccttgtgcgc cggggacgtt ctccaacacg acttcataccca cggatatttgc caggccccac 25 cagatctgtt acgtgttgc cattcctggg aatgcaagca tggatcgact ctgcacgc acgtccccca cccggagttat gggcccgaggc gcaatcact taccggcggc agtgtccaca cgatcccaac acacgcggc aactccagaa cccagcactg ctccaaaggcac ctcccttcgt ctcccaatgg gccccaggccc cccagctgaa gggagcactg ggcacggcggc caagtcctgc gacaagaccc acacccgtccc cccctggccc gccccggagc tgctggcgcc cccctccgt 30 ttcttgtttcc cccccaagcc caaggacacc ctgtatgtatct cccgcacccc cgagggtgacc tgcgtgttgg tggacgtgtc ccacaggagc cccggaggta agttcaactg gtacgtggac ggcggtggagg tgccacaacgc caagaccaag ccccgccggagg agcagttacaa ctccacatc cgctgtgtt ccgtgtgtc ctgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggactacaag tgcaagggtt ccaacaaggc cctggccggc cccatgcaga agaccatctc caaggccaaag 35 ggccagcccc gagggcccca ggtgtacacc ctggccccc cccgcacgc gctgatccaaag aacccagggtt cccgtgtgtc cctgtgttgg aag ggtttctacc cccgcacat cccgggtggag tggggatccca acggccaggcc cgagaacaaac taacagacca cccccccgt gctggactcc gacggctctt ctgtgtgtt ctccaaaggc accgtggaca agtcccgctg gcagcaggcc aacgtgtttt cctgtgtgtt gatgcacgag gcccgtgcaca accactacac ccagaaggcc 40 ctgtccctgtt ccccccggcaag ggacccctt gggggaaaaat ccagcaagat gcaagec 1140 1200 1260 1320 1380 1440			

	agaatctggg atgttaacca gaagaccc tc tatctgagga acaaccact agttgcigga	1500
	tacttgc aag gcccaaatgt caatttagaa gaaaagatag atgtggta cc tattgagc ct	1560
	catgctctgt tcttggaaat ccatggagg aagatgtgc tg tccctgtt caagtctgt	1620
	gatgagacca gactccagct ggaggcagtt aacatca ctg acctgagcga gaacagaaag	1680
5	caggacaagg gc ttcgcctt catccgc tca gacagtgcc cc accaccag tt ttagtct	1740
	gcccctgcc ccgggttggtt cctctgcaca gcatggaaat ctgaccaggcc cgtcagcc tc	1800
	accaatatgc ctgacgagg cgtcatggtc accaaattct acttccaggaa ggacgag	1857
10	<210> 6	
	<211> 1857	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> IL1Ra-Ig-p75 融合蛋白的编码序列	
20	<400> 6	
	cgaccctctg ggagaaaatc cagcaagatg caagcc tca gaatctggg tttt accag	60
	aagaccc tctt atctgaggaa caacc aacta gt tggat acttgc aagg accaaatgtc	120
	aattttagaa aaaaat gata tttggatcc atttggatctc atgtctgtt ttggaaatc	180
	catggaggga agatgtgc ct gtcctgtgtc aagtctggtg atgagaccag actccagctg	240
25	gaggcagttt acatca ctg a cccatggc gag aacagaaagg aggacaagg ct tccgcctc	300
	atccgc tca g acatggcc caccaccatg tttgatctg ccgcctgc cc gttggc ttc	360
	c tctgc acag cgatggaaage tgaccagcc gtcagcc tca ccaatatg cc tgacgaaaggc	420
	gtcatgg tca ccaattctt ct tccaggag gacgaggagc ccaagtcctg cgacaaggacc	480
	cacacctg cc cccctg ccc cccccccgag ct gctggc gccccctccg gttcc tgc	540
30	ccccccaaagg ccaaggacac cctgatgatc tcccgaccc cccgagg tgc ctgcgtgg	600
	gtggacgtgtt cccacgagga ccccgagg tgc aactt ggtacgtgg a cggcgtggag	660
	gtgcacaacg ccaagaccaa gccccgc gacgactaca actccacca tccgcgtgg	720
	tccgtgtga ccgtgtgc ccaggactgg ctgaaacggca aggactaca gtgcaagg	780
	tccaaacaaagg ccctgccc ccccatgc aagaccatct ccaaggccaa gggccagcc	840
35	cgcgagcccc aggtgtacac cctggccccc tcccgacg agctgaccaaa gaaccagg	900
	tccctgaccc gcttggtaa gggcttctac ccccgccaca tcgcctgg a tgggatcc	960
	aacggccagc ccgagaacaa ctacaaggacc acccccccc tgc tggactc cgacggc tcc	1020
	ttcttccctgt actccaagct gaccgtggac aagtccct ggcagcagg caacgtgtc	1080
	tccctgctccg t gatgcacga gccccctgac aaccactaca cccagaaggc tctgtccctg	1140
40	tccccccggca agttggccgc ccagggtggca tt tacaccct acgccccggaa gccccggagc	1200

	acatggccgc tcagagaata ctatgaccag acagctcaga tggctgcag caaatgcctcg	1260
	ccggggcaac atgaaaagt cttctgtacc aagacctcg acaccgtgt tgactcctgt	1320
	gaggacagca catacacccaa gctctggAAC tgggttcccg agtgcttgag ctgtggctcc	1380
5	cgctgttagct ctgaccagggt ggaaactcaa gcctgcactc gggAACAGAA ccgcacatctgc	1440
	acctgcaggc cgggctggta ctgegcgtg agcaaggcagg aggggtgcgg gctgtgcgcg	1500
	ccgctgcgcgca agtgcgcgcg gggcttcggc gtggccagac caggaactga aacatcagac	1560
	gtgggtgtgca egccctgtgc cccggggacg ttctccaaca cgacttcattt cacggatatt	1620
	tgcaggcccc accagatctg taacgtggtg gccatccctg ggaatgcaag catggatgca	1680
10	gtctgcacgt ccacgtcccc cacccggagt atggccccag gggcagtaca cttaaaaaag	1740
	ccagtgtcca cacatccca acacacgtac ccaactccag aaccacgcac tgctccaagc	1800
	acctccctcc tgcctccaaat ggccccagc ccccaagctg aaggagcac tggcgac	1857

<210> 7
15 <211> 1206
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
20 <221> misc_feature
<223> IL1Ra-连接序列-p75 融合蛋白的编码序列

<400> 7

25	cgaccctctg ggagaaaatc cagcaagatg caagccctca gaatctggga tggtaaccag	60
	agacccctctt atctgaggaa caaccaacta gttgctggat acttgcagg accaaatgtc	120
	aatttagaag aaaagataga tggttaccc attgacgcctt atgcctgtt ctggaaatc	180
	catgggggaa agatgtgcct gtcctgtgtc aagtctggtg atgagaccag actccagctg	240
	gaggcagttt acatcaactg cctgagcggag aacagaagc aggacaagc ttccgcctc	300
30	atccgcgtcag acatggccc caccaccgtt ttggatctg ccgcctgcgg cggtgggttc	360
	ctctgcacag cgatggaaagc tgaccagccc gtcagccctca ccaatatgtc tgacgaaggc	420
	gtcatggtca ccaaatgtt cttccaggag gacgaggggc gggcggcgtc cggcggcgc	480
	ggctccggcg gggcggcgtc cttggccggc caggtggcat ttacacccta cgcccccggag	540
	cccgggagca catggccgtc cagagaatac tatgaccaga cagtcatgt gtgtgcage	600
35	aaatgcgtcgc cggggcaaca tgcaaaaatgc ttctgttacca agacccgtggc caccgtgtgt	660
	gactccgtgtc aggacacgtac atacacccag ctctggaaact gggttcccgaa gggcttgagc	720
	tgtggctccc gctgttagctc tgaccagggt gaaactcaag ccgtcactcg ggaacagaaac	780
	cgcatctgca ctgcaggccc cggctggatc tgccgcgtga gcaaggcaggaa ggggtgcgg	840
	ctgtgcgcgc cgctgcgcac gtggcccccgg ggcttcggc tggccagacc aggaactgaa	900
40	acatcagacgt tggtgtgcaaa gcccgtgtcc cggggacgt tctccaacac gacttcatcc	960

acggatattt	gcaggccccca	ccagatctgt	aacgtgggtgg	ccatccctgg	gaatgcaagg	1020
atggatgcag	tctgcacgtc	cacgtcccccc	accggagta	tggcccccagg	ggcagttacac	1080
ttaccccgac	cagigtccac	acgatcccaa	cacacgeagc	caactccaga	accaggcact	1140
gctccaagca	cctcttctt	getccaaatg	ggccccagcc	ccccagctga	aggggacact	1200
5	ggcgac					1206

<210> 8
<211> 1206
10 <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
15 <223> p75-连接序列-IL1Ra融合蛋白的编码序列

	ttggccggcc aggtggcatt tacaccctac gccccggagc cccggggcac atggccggc	60
20	agagaatact atgaccagac agtcagatg tgctgcagea aatgtctgcc gggccaacat gcaaaaagtct tctgtaccaa gacctcgac accgtgtgtc actcttgiga ggacagcaca tacacccaggc tctggaaactg ggttcccgag tgcttgagct gtggctcccg ctgttagctt gaccagggtt aaactcaagc ctgcaactcgga acacagaacc gcatctgcac ctgcaggccc ggctgttact ggcgcgttag caagcaggag gggtgcggc tgcgcgcgc gtcgcgcag	120 180 240 300 360
25	tgcggccgg gcttcggcgt gggcagacca ggaactgaaa catcagacgt ggtgtgcag ccctgtggcc cggggacgtt ctccaacacg acttcatcca cggatatttgc caggccccac cagatctgtt acgtgtgtgc catccctggg aatgcgaacgca tggatgcagt ctgcacgtcc acgtccccca cccggagttt gggcccgagg gcagttacact taccccgacca agtgtccaca cgatccccac acacgcagcc aactcccgaa cccagcactg ctccaaagcac ctcccttcig	420 480 540 600 660
30	ctcccaatgg gccccagccc cccagctgaa gggagcactg ggcacggcgg cgccggcgtcc ggcggccggc gctccggcgg cggccggctcc cggacccttcg ggagaaaaatc cagcaagatg caaggccctca gaatctggga tggtaaccag aagacccttc atctggggaa caaccaacta gttgcgttggat acttgcagg accaaaatgtc aattttagaag aaaagataga tggatgcacc attggccctc atgtctgtt ctggaaatc catggaggga agatgtgcct gtccctgttc	720 780 840 900 960
35	aagttctggtg atgagaccag acttcagatg gaggcagttt acatcactga cctgagcggag aacagaaaagc aggacaagcg ctgcgccttc atccgcgttc acagttggccc caccaccagt tttggatctg ccgcctggcc cgggtggttc ctctgcacac cgaatggaaatc tgaccagccc gttcgcgttca ccaaatatgtcc tgacgaaggc gtcatggtca ccaaattctt cttccaggag gacgag	1020 1080 1140 1200 1206

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
5 <213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 连接序列
10
<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
15

<210> 10
<211> 45
<212> DNA
20 <213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 连接序列的编码序列
25
<400> 10

ggcggcgccg gctccggcgg cggcggctcc ggccggccgcg gctcc 45

30
<210> 11
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
35
<220>
<221> misc_feature
<223> 引物

40 <400> 11

cagaagctta ttttgcggc ccaggtagca ttacaccct ac 42

5 <210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

10 <220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 12

15 gtcgcaggac ttgggctcggt cggcagtgtt ccattc 36

<210> 13
20 <211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

25 <221> misc_feature
<223> 引物

<400> 13

30 ctggccgggg gacaggac 19

<210> 14
<211> 30
35 <212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature
40 <223> 引物

5 <400> 14
cagcgacccct ctgggagaaa atccagcaag 30
5
10 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 10 <213> 人工序列

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
15
15 <400> 15

20 caggaattcc tcgtccctcc t ggaagttag 28
20
20 <210> 16
 <211> 39
 <212> DNA
 20 <213> 人工序列
25
25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物

30 <400> 16

35 gtccccgttcc cccggcaagg gaccctctgg gagaaaaatc 39
35
35 <210> 17
 <211> 84
 <212> DNA
 35 <213> 人工序列

40 <220>

```
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 17
5
aatgccacct gggcgccaa ggagccgccc ccgcggagc cgcgcggcc ggagccgccc       60
ccgcctcgt ctcctggaa gtag                                84

10 <210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

15 <220>
<221> misc_feature
<223> 引物

<400> 18
20
cagaagctta tgcgaccctc tgggagaaaa tccagcaag                                39

25 <210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
30 <221> misc_feature
<223> 引物

<400> 19

35 caggaattcg tcgccagtgc tcccttcage                                30
```

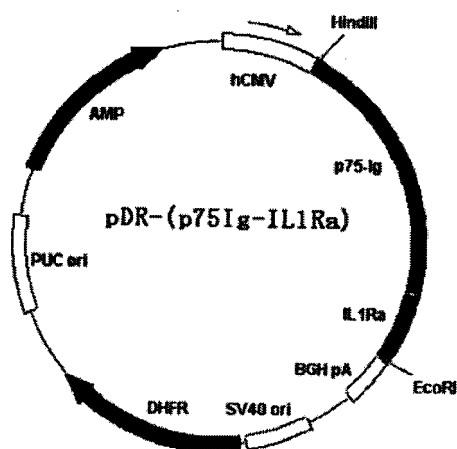


图 1

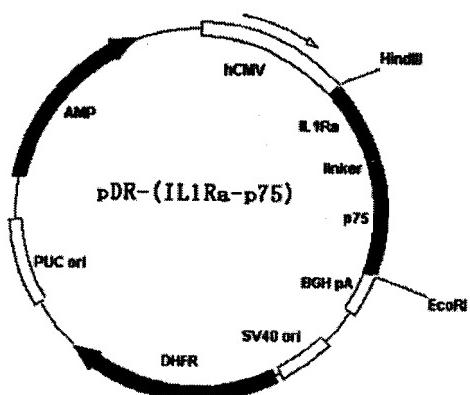


图 2